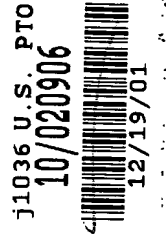


IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re U.S. Patent Application of)
)
KOJIMA et al.)
)
Application Number: To Be Assigned)
)
Filed: Concurrently Herewith)
)
For: METHOD FOR ISOLATING AND PURIFYING)
NUCLEIC ACIDS)



Honorable Assistant Commissioner
for Patents
Washington, D.C. 20231

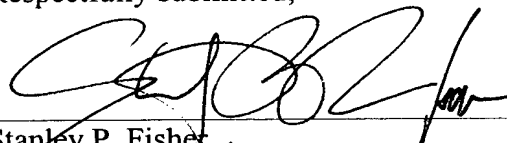
**REQUEST FOR PRIORITY
UNDER 35 U.S.C. § 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Sir:

In the matter of the above-captioned application for a United States patent, notice is hereby given that the Applicant claims the priority date of June 5, 2001, the filing date of Japanese patent application 2001-169566.

The certified copy of Japanese patent application 2001-169566 is being submitted herewith. Acknowledgment of receipt of the certified copy is respectfully requested in due course.

Respectfully submitted,



Stanley P. Fisher
Registration Number 24,344

JUAN CARLOS A. MARQUEZ
Registration No. 34,072

REED SMITH HAZEL & THOMAS LLP
3110 Fairview Park Drive
Suite 1400
Falls Church, Virginia 22042
(703) 641-4200

December 19, 2001

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 6月 5日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-169566

出 願 人

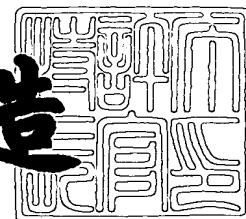
Applicant(s):

株式会社日立製作所

2001年10月19日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3092561

【書類名】 特許願

【整理番号】 H100400

【提出日】 平成13年 6月 5日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07H 21/00

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社
 日立製作所 中央研究所内

 【氏名】 小島 恭子

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社
 日立製作所 中央研究所内

 【氏名】 小澤 理

【特許出願人】

 【識別番号】 000005108

 【氏名又は名称】 株式会社 日立製作所

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 015244

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸の精製分離方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (1) 核酸を含有する試料、塩、及び有機溶剤を含む混合液から前記核酸を担体に吸着させる工程と、

(2) 緩衝剤を含む溶出液によって前記核酸を前記担体から脱離させて回収する工程とを有し、

前記有機溶剤が、脂肪族エーテル、脂肪族エステル、脂肪族ケトンの中から選ばれた 2 から 10 個の炭素数を有する化合物の 1 種または 2 種以上の組み合わせであることを特徴とする核酸の精製分離方法。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の核酸の精製分離方法に於いて、前記脂肪族エーテルが、エチレングリコールジメチルエーテル、エチレングリコールジエチルエーテル、プロピレングリコールジメチルエーテル、プロピレングリコールジエチルエーテル、ジエチレングリコールジメチルエーテル、ジエチレングリコールジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、及び 1、4 - ジオキサンの何れか 1 種または 2 種以上の混合物であることを特徴とする核酸の精製分離方法。

【請求項 3】 請求項 1 に記載の核酸の精製分離方法に於いて、前記脂肪族エステルが、プロピレングリコールモノメチルエーテルアセテート及び乳酸エチルの何れかまたは双方の混合物であることを特徴とする核酸の精製分離方法。

【請求項 4】 請求項 1 に記載の核酸の精製分離方法に於いて、前記脂肪族ケトンが、ヒドロキシアセトン、アセトン、及びメチルエチルケトンの何れか 1 種または 2 種以上の混合物であることを特徴とする核酸の精製分離方法。

【請求項 5】 請求項 1 に記載の核酸の精製分離方法に於いて、前記有機溶剤が、脂肪族エーテル、脂肪族エステル、脂肪族ケトンの中から選ばれた 1 種類の化合物であることを特徴とする核酸の精製分離方法。

【請求項 6】 請求項 1 に記載の核酸の精製分離方法に於いて、前記有機溶剤が、脂肪族エーテル、脂肪族エステル、脂肪族ケトンの中から選ばれた複数種類の化合物の混合物であることを特徴とする核酸の精製分離方法。

【請求項 7】 請求項 1 に記載の核酸の精製分離方法に於いて、前記混合液

中における前記有機溶剤の濃度が 5 0 容量%以下であることを特徴とする核酸の精製分離方法。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の核酸の精製分離方法に於いて、前記有機溶剤の濃度が 5 容量%～5 0 容量%であることを特徴とする核酸の精製分離方法。

【請求項 9】 請求項 1 に記載の核酸の精製分離方法に於いて、前記混合液が 5 0 容量%以下の界面活性剤を含むことを特徴とする核酸の精製分離方法。

【請求項 1 0】 請求項 9 に記載の核酸の精製分離方法に於いて、前記混合液が 5 容量%～5 0 容量%の界面活性剤を含むことを特徴とする核酸の精製分離方法。

【請求項 1 1】 請求項 1 に記載の核酸の精製分離方法に於いて、前記混合液が 0. 2 容量%～2. 5 容量%の消泡剤を含むことを特徴とする核酸の精製分離方法。

【請求項 1 2】 以下の工程 (a) ～ (d) :

- (a) 核酸を含有する試料に、塩及び有機溶剤を添加して混合液を得る工程、
- (b) 底部に吸着担体を充填したカラムに上記混合液を移し、カラム底部開口部からの吸引により核酸を該吸着担体に吸着させる工程、
- (c) カラムに洗浄液を注入し、吸引により吸着担体を洗浄する工程、
- (d) 緩衝剤を含む溶出液を添加して吸着担体から核酸を溶離させ、吸引により回収する工程、

とを有し、前記有機溶剤が、脂肪族エーテル、脂肪族エステル、脂肪族ケトンの中から選ばれた 2 から 1 0 個の炭素数を有する化合物の 1 種または 2 種以上の組み合わせであることを特徴とする核酸の精製分離方法。

【請求項 1 3】 以下の工程 (a) ～ (d) :

- (a) 核酸を含有する試料に、塩及び有機溶剤を添加して混合液を得る工程、
- (b) 吸着担体を低密度に充填したカラムに上記混合液の複数回の吸引吐出操作により核酸を吸着させる工程、
- (c) 洗浄液の吸引吐出操作により吸着担体を洗浄する工程、
- (d) 緩衝剤を含む溶出液を添加して吸着担体から核酸を溶離させ、吐出操作によって回収する工程、

とを有し、前記有機溶剤が、脂肪族エーテル、脂肪族エステル、脂肪族ケトンの中から選ばれた 2 から 1 0 個の炭素数を有する化合物の 1 種または 2 種以上の組み合わせであることを特徴とする核酸の精製分離方法。

【請求項 1 4】 塩及び有機溶剤を含む吸着液と、緩衝剤を含む溶出液とを含み、核酸を担体に吸着させた後に該核酸の精製回収を行うために使用する試薬キットであって、有機溶剤として脂肪族エーテル、脂肪族エステル、脂肪族ケトンの中から選ばれた 2 から 1 0 個の炭素数を有する化合物の 1 種または 2 種以上の組み合わせを含有する、上記試薬キット。

【請求項 1 5】 前記脂肪族エーテルが、エチレングリコールジメチルエーテル、エチレングリコールジエチルエーテル、プロピレングリコールジメチルエーテル、プロピレングリコールジエチルエーテル、ジエチレングリコールジメチルエーテル、ジエチレングリコールジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、及び 1、4 - ジオキサンの何れか 1 種または 2 種以上の混合物から選択される、請求項 1 4 に記載の試薬キット。

【請求項 1 6】 前記脂肪族ケトンが、ヒドロキシアセトン、アセトン、及びメチルエチルケトンの何れか 1 種または 2 種以上の混合物から選択される、請求項 1 4 に記載の試薬キット。

【請求項 1 7】 前記脂肪族ケトンが、ヒドロキシアセトン、アセトン、及びメチルエチルケトンの何れか 1 種または 2 種以上の混合物から選択される、請求項 1 4 に記載の試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生体試料等の核酸を含有する試料から核酸を溶出させて核酸を精製して分離する核酸の精製分離方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

従来技術に於ける有効な核酸の精製分離方法は、カオトロピック塩の存在下で核酸をガラスやシリカゲル粒子へ吸着させ核酸を回収する原理に基づいている（

Vogelstein, B. および Gillespie, D. (1979): 「アガロースからの DNA の調製のおよび分解的精製」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 615-619)。この方法によれば、ヨウ化ナトリウム、過塩素酸ナトリウム、またはグアニジンチオシアン酸塩等の高濃度のカオトロピック塩を用いると、DNA がアガロースから単離、精製され、あるいは、RNA または DNA が種々の混合物から単離、精製される (Boom, R. (1990): 核酸の迅速で簡易な精製法、J. Clin. Microbiol. 28: 495-503)。

【0003】

核酸は精製の後に、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) (Polymerase chain reaction) に使用されることが多い。PCR 反応によれば、核酸を配列特異的に増幅することが可能なため、遺伝子診断等に広く応用されている。この PCR 法を日常的に臨床で使用する際に、いくつかの問題点が存在する。その中でも、核酸精製時に除去できなかった阻害物質の影響で、PCR 反応が阻害される事が知られている。阻害物質としては、ヘモグロビン、核酸の抽出工程で使用する界面活性剤等が知られている。このような背景により、核酸の抽出、精製工程は、重要であることが指摘されている (大島ほか、JJCL A, 22(2), 145-150(1997))。

【0004】

また、抽出工程は従来、手動で行われてきたが、操作が煩雑で熟練性を要することから、装置による自動化が望まれている。そして、使用する試薬等を含め、自動化に適した抽出法の開発が要求されている。自動化に適した核酸の抽出法として、特開平 11-127854 号に記載の方法および特開平 11-266864 号に記載の装置を用いた方法がある。さらに、自動化装置による抽出に適した試薬としては、特表平 8-501321 号に記載のものが知られている。特表平 8-501321 号に記載の試薬を用いた方法では、高濃度の塩 (イオン強度) および高濃度のアルコールを含む溶液から分離精製すべき核酸を抽出用チップ内の吸着担体に接触させて吸着させ、次いで、より低濃度の塩 (イオン強度) を含む溶液によって吸着担体から脱着して目的の核酸を得ることができる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

特表平 8-501321 号に記載の試薬を用いた核酸の精製分離方法では、核

酸の回収の収率が低いという問題があった。また、特開平 1 1 - 1 2 7 8 5 4 号に記載の抽出用チップを用いた方法では、高濃度の塩（イオン強度）および高濃度のアルコールを含む溶液から分離精製すべき核酸を抽出用チップ内の吸着担体に接触させて吸着させる工程において、溶液の粘度が高いために、操作に長い時間を要することが問題であった。

本発明の目的は、回収の収率を向上させるとともに、核酸回収までに要する時間を短縮し、操作性に優れ、汚染の影響が少ない核酸の精製分離方法を提供することにある。

【 0 0 0 6 】

【課題を解決するための手段】

本発明の核酸の精製分離方法では、核酸を含有する試料、高濃度の塩、及び有機溶剤を含む混合液から前記核酸を無機担体に吸着させ、次に、水溶液からなる溶出液によって核酸を無機担体から脱離させて回収する。必要に応じて回収の前に、核酸以外の成分を取り除くための洗浄液を用いて担体を洗浄する。核酸は例えば全血の白血球に由来する。

【 0 0 0 7 】

塩としては、カオトロピック塩を使用し、例えば、グアニジン塩酸塩、グアニジンイソチアン酸塩、ヨウ化カリウムの何れかを濃度 1 M から 8 M の範囲で使用する。

有機溶剤（有機化合物）は、脂肪族エーテル、脂肪族エステル、及び脂肪族ケトンの中から選ばれた 1 種類又は複数種類の化合物であり、炭素数 2 から 1 0 を有する化合物である。混合液の有機溶剤の濃度は 5 容量%～5 0 容量%とする。

【 0 0 0 8 】

混合液の有機溶剤（有機化合物）として使用可能な脂肪族エーテルの代表的な例としては、エチレングリコールジメチルエーテル、エチレングリコールジエチルエーテル、プロピレングリコールジメチルエーテル、プロピレングリコールジエチルエーテル、ジエチレングリコールジメチルエーテル、ジエチレングリコールジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1、4 - ジオキサンをあげることができる。

混合液の有機溶剤（有機化合物）として使用可能な脂肪族エステル为代表的な例としては、プロピレングリコールモノメチルエーテルアセテート、乳酸エチルをあげることができる。

混合液の有機溶剤（有機化合物）として使用可能な脂肪族ケトンの代表的な例としては、ヒドロキシアセトン、アセトン、メチルエチルケトンをあげることができる。

本発明においては、混合液に、0.1容量%～50容量%の界面活性剤を含ませ、より好ましくは、界面活性剤として0.1容量%～5容量%の消泡剤を使用すると良い。

【0009】

無機担体としては、シリカ、アルミナ、ゼオライト、二酸化チタン等からなる多孔性材料又は非多孔性材料を使用する。

洗浄液は、アルコール等の有機溶剤を高濃度に含むものであり、吸引又は遠心分離操作により無機担体を複数回洗浄して核酸以外の成分を取り除く。

本発明の核酸の精製分離方法によれば、核酸を含む溶液の粘度が減少し、気泡の発生が抑制され、かつ、消泡が促進されるので操作性が向上し、汚染の影響を受けにくく、核酸の回収量が増加する。また、核酸回収までに要する操作時間も短縮できる。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明の核酸の精製分離は、図1に示された方法に基づいて行う。この方法は、特開平11-127854号に記載されており、4つの工程から構成される。

【0011】

図2から図5は、上記特開平11-127854号公報に記載の図1の方法に基づいた、本発明の核酸抽出試薬を用いた全血からの核酸抽出の手順を説明する図である。以下の説明では、ヒト全血100 μ Lからの核酸抽出を例とする。図2に示すように、ヒト全血1の中には、赤血球2、白血球3等の成分が含まれており、核酸は主に白血球3内の核4に存在している。

【0012】

図3に示すように、まず、チューブ5に10 μ LのProteinase K (6) を注入する。次に、チューブ5に100 μ Lの全血1を加える。この工程が101である。次に、100 μ Lの反応液を加えて攪拌する。この工程が102である。この反応液は1Mから8Mのカオトロピック塩と50容量%以下の界面活性剤を含む。チューブ5の溶液を56℃で10分間インキュベートすることにより、白血球が破壊され、核4内の核酸が溶液内に出る。この工程が103である。その後、添加液（例えば、EGDE（エチレングリコールジエチルエーテル）、DIGLYME（ジエチレングリコールジメチルエーテル）等の有機溶剤）を100 μ L加えて攪拌すると、混合液7が得られる。この工程が104である。ここまでの操作を分解工程と呼ぶ。

この分解工程以降は、数種類の核酸回収法がある。何れの方法も、吸着工程、洗浄工程、回収工程からなる。代表的な例として、スピнкаラム法、吸引吐出法がある。

【0013】

図4はスピнкаラム法（以下、第1の方法という）を示す。添加液を加えた後のチューブ5の混合液7をスピнкаラム8の中へ移す。スピнкаラム8の底部には非常に細かいシリカ又はガラス繊維からなる濾紙状の吸着担体9が充填されている。添加液を含む混合液7を、吸引により吸着担体9内を通過させて、核酸を吸着担体9に吸着させる（吸着工程）。この工程が105である。その後、アルコール等の有機溶剤を20%から80%含む500 μ Lの洗浄液11をスピнкаラム8に注入する。この工程が106である。次に、吸引により吸着担体9を洗浄し、核酸以外の成分を取り除くのが工程107である（洗浄工程）。この洗浄工程は2回繰り返すが、吸着した核酸は溶離しない。その後、低塩濃度の溶出液12を添加して、2分間から5分間静置する。この工程が108である。核酸を吸着担体9から溶離させ、最後に、吸引により、チューブ10に回収するのが工程109である（溶出工程）。代表的な溶出液の組成は、50 mmol Tris/HCl (pH 8.5)、0.1 mmol EDTA \cdot 2 Naである。第1の方法においては、簡便かつ迅速な処理のために、各工程において遠心分離操作を使用することができる。

【0014】

図5は吸引吐出法（以下、第2の方法という）を示す。第2の方法では、吸着担体13としてガラス、石英等の繊維を低密度に充填した円筒型中空のカラム14を使用する。このカラム14で添加液を加えた後の混合液7を複数回吸引吐出を繰り返し、吸着担体13に核酸を吸着させるのが工程110である（吸着工程）。続いて、500 μ Lのアルコール等の有機溶剤を20%から80%含む洗浄液15を入れた別のチューブ16を使用して吸引吐出を行ない、核酸以外の成分を取り除く。この洗浄工程は、2回以上行う。その後、予め70℃に加熱したチューブ17内の溶出液18（100 μ L）をカラム14内の吸着担体13に接触する位置まで吸い上げた状態で約2分間静止する。この工程が111である。この操作により、核酸が吸着担体13から溶出液18に溶離する。溶出液18を吐出させて、核酸を回収する。この工程が112である。代表的な溶出液の組成は、50mmol Tris/HCl(pH8.5)、0.1mmol EDTA \cdot 2Naである。

以下、実施例で使用する材料、薬品、試料について詳細に説明する。

【0015】

1. 核酸吸着材料およびカラム

1. 1 スピンカラム

例えば、Whatman社のガラス繊維ろ紙を3層、遠心分離クロマトグラフィカラム（スピンカラム）に固定した。図4に示す第1の方法のプロトコルにて使用した。

1. 2 核酸捕捉用カラム

特開平11-266864号に記載の核酸捕捉用チップに使用した直径0.5 μ m \sim 30 μ mの石英繊維（東ソー・クオーツ株式会社製または東芝セラミックス株式会社製）を充填した。これを図5に示す第2の方法のプロトコルにて使用した。

【0016】

2. 核酸を含有する試料

2. 1 血液（ヒト）

採血直後の血液、あるいは-20℃で凍結保存した血液を使用した。

2. 2 組織

新鮮組織あるいは凍結保存した組織を使用した。

2. 3 植物

植物を液体窒素下、乳鉢ですりつぶし、直接使用、あるいは凍結保存して用いた。

2. 4 細胞

単離、または単離／培養された細胞を直接使用、または凍結保存していた細胞を用いた。

【0017】

3. 試薬

3. 1 反応液

反応液は、以下に示すカオトロピック塩、界面活性剤、消泡剤、その他塩成分から構成される。

3. 1. 1 カオトロピック塩

カオトロピック塩として、以下のいずれかを使用した。

KI : ヨウ化カリウム

GuHCl : グアニジン塩酸塩

GuHSCN : グアニジンチオシアン酸塩

3. 1. 2 界面活性剤

界面活性剤として、以下のいずれかを使用した。

Tween20 : ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート

Tween40 : ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノパルミテート

Tween60 : ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノステアレート

Tween80 : ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレート

Tween85 : ポリオキシエチレン (20) ソルビタントリオレート

TritonX-100 : ポリオキシエチレン (10) イソオクチルフェニルエーテル

3. 1. 3 消泡剤

CE-457 : 日本油脂株式会社製の消泡剤ディスホーム、ポリアルキレングリコール誘導体

3. 1. 4 その他の塩

EDTA・2Na : エチレンジアミン四酢酸・二ナトリウム塩

Tris : トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン

3. 2. 添加液

添加液には、以下のいずれかの有機溶剤を使用した。

EGDME : エチレングリコールジメチルエーテル

EGDEE : エチレングリコールジエチルエーテル

PGDME : プリピレングリコールジメチルエーテル

PGDEE : プロピレングリコールジエチルエーテル

DIGLYME : ジエチレングリコールジメチルエーテル

DGDEE : ジエチレングリコールジエチルエーテル

THF : テトラヒドロフラン

DX : 1, 4-ジオキサン

PGMEA : プロピレングリコールモノメチルアセテート

EL : 乳酸エチル

HAC : ヒドロキシアセトン

AC : アセトン

MEK : メチルエチルケトン

3. 3 洗浄液

洗浄液には、以下のいずれかの組成を用いた。

W1 : 25 mmol/l 酢酸カリウム、70容量%エタノール

W2 : 25 mmol/l 酢酸カリウム、50容量%エタノール

W3 : 25 mmol/l Tris/HCl、50容量%エタノール

W4 : 10 mmol/l Tris/HCl(pH8.5)、0.1 mmol/l EDTA・2Na、50
容量%エタノール

3. 4 溶出液

溶出液には、以下のいずれかの組成を用いた。

E1 : 水 (100%)、pH8.0

E2 : 10 mmol/l Tris/HCl(pH8.5)、0.1 mmol/l EDTA・2Na

E3 : 50 mmol/l Tris/HCl(pH8.5)、0.1 mmol/l EDTA・2Na

3. 5. 酵素

以下のいずれかの酵素を用いた。

protease : タンパク分解酵素プロテアーゼ

proteinase K : アルカリ性プロテイナーゼ K

【0018】

【実施例】

実施例 1 全血からの核酸抽出 1

図 3 および図 5 に示された第 2 の方法に従ってヒト全血 1 (100 μ L) からの核酸抽出を行った。分解工程では、proteinase K (6) (10 μ L) を入れたチューブ 5 に、全血 1 (100 μ L) および反応液 (100 μ L) を添加、攪拌し、混合液を得た。ここで用いた反応液は、濃度 3 M のグアニジン塩酸塩、5 容量% の TritonX-100 を含んでいる。混合液を 70℃ で 10 分間インキュベートした。その後、EGDME、EGDEE、PGDME、PGDEE、DIGLYME、DGDEE、THF、DX、PGMEA、EL、HAC、AC および MEK の中から選ばれた添加液 (100 μ L) を加え、攪拌した。

【0019】

吸着工程では、吸着担体 13 (東芝セラミックス株式会社製) を充填したカラム 14 を用いて、混合液 7 の吸引および吐出の操作を 10 回繰り返し行った。

洗浄工程では、別のチューブ 16 に入れた洗浄液 (W1) 15 の吸引吐出の操作を 3 回繰り返し行った。

回収工程では、別のチューブ 17 に入れた溶出液 18 を、吸着担体 13 の全体が浸漬する位置まで吸上げて、2 分間静止した。その後、溶出液 18 を吐出し、核酸溶液を回収した。

得られた核酸溶液は、沈殿精製等の工程無しで次の PCR 等の反応や分析に使用することができた。

【0020】

表 1 は、各種添加液を用いたときの核酸収量と、抽出した核酸溶液における核酸の純度の指標となる A260/A280 を示す。

【表 1】

表 1

No.	添加液	核酸収量 (μg)	A 2 6 0 / A 2 8 0
1	EGDME	1. 6	1. 7
2	EGDEE	1. 8	1. 8
3	PGDME	1. 5	1. 7
4	PGDEE	1. 4	1. 8
5	DIGLYME	1. 9	1. 9
6	DGDEE	1. 8	1. 8
7	THF	1. 5	1. 7
8	DX	1. 5	1. 8
9	PGMEA	1. 4	1. 7
10	EL	2. 0	1. 9
11	HAC	1. 6	1. 8
12	AC	1. 5	1. 7
13	MEK	1. 3	1. 7

【0 0 2 1】

ここで、A260は、核酸を含んだ水溶液の波長260nmにおける吸光度を表す。A260/A280の値が1. 8であるときに、核酸が純粋であるとされている。また、A260/A280の値が1. 7から1. 9の間であるときに、十分な純度であるとされている。表1における一連の実験では同一の酵素 (proteinase K)、反応液、洗浄液および溶出液を使用した。得られた核酸は、二本鎖核酸を定量するための蛍光色素PicoGreen (Molecular Probes Inc.) を用いて、蛍光測定により、定量を行った。いずれの添加液を用いた場合でも、高純度の核酸が得られたことが判る。

【0 0 2 2】

図6は、添加液DIGLYMEの添加量を変化させたときの核酸収量の変化を示している。横軸は混合液7中のDIGLYME濃度 (容量%)、縦軸は最大収量を100とした時の相対収量 (%) を表す。相対収量が80%以上のときに、

目標の収量が得られる。DIGLYME濃度が5%から50%にかけて相対収量80%以上の収量が得られ、特に、約43%の時に最大収量が得られることが判る。

【0023】

図7は、添加液ELの添加量を変化させたときの核酸収量の変化を示している。一連の実験では同一の酵素 (proteinase K)、反応液、洗浄液および溶出液を使用した。相対収量が80%以上のときに、目標の収量が得られる。EL添加量が10%から50%にかけて相対収量80%以上の収量が得られ、特に約33%の時に最大収量が得られることが判る。

【0024】

図8は、添加液として、DIGLYMEとELを混合して使用したときの核酸収量の変化を示している。ここでは、添加液の添加量は混合液全体の33%に相当する。図8の横軸は、添加液中のDIGLYME比率(体積比)を表す。相対収量が80%以上のときに、目標の収量が得られる。任意のDIGLYME比率において目的の収量が得られることが判る。

【0025】

図9、図10および図11は、反応液中の界面活性剤濃度と核酸収量との関係を示す。図9—図11の一連の実験では酵素としてproteinase K、添加液、洗浄液および溶出液を使用した。相対収量が80%以上のときに、目標の収量が得られる。界面活性剤含有量が5%から50%において相対収量80%以上の核酸収量が得られることが示されている。

【0026】

図12は、混合液7中の消泡剤 (CE-457) 添加量と核酸収量との関係を示す。一連の実験では同一の酵素 (proteinase K)、添加液、洗浄液および溶出液を使用した。反応液については、消泡剤以外の組成は同一である。消泡剤添加量が0.2%から2.5%において相対収量80%以上の高い核酸収量が得られることが示されている。したがって、消泡剤の添加は、混合液における起泡の抑制のみならず、核酸収量の向上にも有効であることが示された。

【0027】

表 2 は、添加液に D I G L Y M E を採用することにより、吸着工程における操作性が向上することを示すものである（*”Organic Solvents, Fourth Edition”, John Wiley & Sons, Inc., 1986）。

【表 2】

表 2

添加液	2 5 °C における粘性係数 η (kg m ⁻¹ s ⁻¹)	吸着工程に要する 時間 (s)
エタノール	1.0826	60
D I G L Y M E	0.989	50

【0 0 2 8】

特表平 8 - 5 0 1 3 2 1 号に記載のアルコールの代表的な化合物であるエタノールと本発明の方法における添加液 D I G L Y M E の粘性を比較すると、D I G L Y M E の粘性のほうが高いために、吸着工程において、混合液の粘性が低下し、カラム 1 4 内での通液抵抗が低下するので、吸着工程に要する時間が 1 0 秒短縮されたことが示されている。また、起泡が抑制されるので、汚染も減少し、操作性が向上した。

【0 0 2 9】

表 3 は、各種添加液の引火点を示すものであり、これらの安全性について検討した（「溶剤ポケットブック」、有機合成化学協会編、オーム社）。

【表 3】

表 3

添加液	引火点 (℃)
エタノール	13
D I G L Y M E	56
E L	52
E G D E E	35
D G D E E	82
E G D M E	-2
T H F	-14
D X	12
A C	-15
M E K	-7

【0030】

引火点を比較すると、エタノールの引火点よりもD I G L Y M E、E L、E G D E EおよびD G D E Eの方が高い。したがって、添加液としては、中でも、D I G L Y M E、E L、E G D E EおよびD G D E Eを用いた方が、爆発や火災等の危険性が低く、安全上好ましいといえることができる。

【0031】

実施例 2 全血からの核酸抽出 2

図 3 および図 5 に示された第 2 の方法に従ってヒト全血 1 (1 mL) からの核酸抽出を行った。分解工程では、proteinase K (6) (100 μ L) を入れたチューブ 5 に、全血 1 (1 mL) および反応液 (1 mL) を添加、攪拌し、混合液を得た。ここで用いた反応液は、濃度 3 M のグアニジン塩酸塩、5 容量%の Trit

onX-100を含んでいる。混合液を70℃で10分間インキュベートした。その後、DIGLYME、エタノールの中から選ばれた添加液を(1 mL)加え、攪拌した。

【0032】

吸着工程では、吸着担体13(100 mg)(東ソー・クオーツ株式会社製)を充填したカラム14を用いて、混合液7の吸引および吐出の操作を10回繰り返し行った。

洗浄工程では、別のチューブ16に入れた洗浄液(W1)(3 mL)15の吸引吐出の操作を3回繰り返し行った。

回収工程では、別のチューブ17に入れた溶出液(1 mL)18を、吸着担体13の全体が浸漬する位置まで吸上げて、2分間静止した。その後、溶出液18を吐出し、核酸溶液を回収した。

得られた核酸溶液は、沈殿精製等の工程無しで次のPCR等の反応や分析に使用することができた。

【0033】

表4は、添加液にエタノールとDIGLYMEを用いたときの、核酸収量と、得られた核酸溶液のA260/A280を示したものである。

【0034】

【表4】

表4

添加液	核酸収量(μg)	A260/A280
DIGLYME	15.0	1.8
エタノール	0.6	1.8

【0035】

添加液としてエタノールを用いた場合には、核酸収量が0.6 μgであったのに対し、DIGLYMEを用いた場合には、15.0 μgであり、添加液として

D I G L Y M E が優れていることが判明した。

【 0 0 3 6 】

実施例 3 全血からの核酸抽出 3

図 3 および図 4 に示された第 1 の方法に従ってヒト全血 1 0 0 μ L からの核酸抽出を行った。

分解工程は実施例 1 と同様に行った。また、使用した酵素、反応液、添加液、洗浄液および溶出液についても実施例 1 と同じであった。

吸着工程では、スピнкаラム 8 に混合液を注ぎ、卓上遠心機（回転数 6 0 0 0 r p m）を用いて、1 分間遠心処理（回転数 6 0 0 0 r p m）を行った。

洗浄工程では、スピнкаラム 8 に、洗浄液（W 2）1 1（5 0 0 μ l）を注ぎ、1 分間遠心処理（回転数 6 0 0 0 r p m）を行った。

回収工程では、スピнкаラム 8 に溶出液（E 2）1 2（1 0 0 μ l）を注ぎ、2 分間室温（2 5 $^{\circ}$ C）で放置した後、1 分間遠心処理（回転数 6 0 0 0 r p m）を行って核酸を回収し、定量、純度評価を行った。

この方法においても、実施例 1 と同様の結果が得られた。

【 0 0 3 7 】

実施例 4 組織からの核酸抽出 1（第 1 の方法）

2 5 m g の肝臓組織（ラット）と 8 0 μ l の P B S（phosphate buffered saline）を混合し、機械的にホモジナイズした。Proteinase K（2 0 μ l）を添加後、攪拌し、組織が溶解するまで 5 6 $^{\circ}$ C に加熱した。濃度 3 M のグアニジン塩酸塩、5 容量 % の Tween 80 を含んだ反応液 2 0 0 μ l を添加して混合液とした後、攪拌、7 0 $^{\circ}$ C で 1 0 分間加熱した。D I G L Y M E（2 0 0 μ l）を添加し、混合した。以上が分解工程である。

【 0 0 3 8 】

吸着工程では、スピнкаラム 8 に混合液を注ぎ、卓上遠心機を用いて、1 分間遠心処理（回転数 6 0 0 0 r p m）を行った。

洗浄工程では、スピнкаラム 8 に洗浄液（W 3）1 1（5 0 0 μ l）を注ぎ、1 分間遠心処理（回転数 6 0 0 0 r p m）を行った。

回収工程では、スピнкаラム 8 に上記 E 1、E 2 および E 3 から選ばれた溶出

液 1 2 (1 0 0 μ l) を注ぎ、2 分間室温 (2 5 $^{\circ}$ C) で放置した後、1 分間遠心処理 (回転数 6 0 0 0 r p m) を行って核酸を回収し、定量、純度評価を行った。

その結果、A260/A280 が 1 . 8 の高純度の核酸が得られ、P C R 反応に使用することが可能であった。

【 0 0 3 9 】

実施例 5 組織からの核酸抽出 2 (第 1 の方法)

2 0 m g のぼうこう組織 (ラット) から、実施例 4 と同様の方法で核酸抽出を行った。その結果、A260/A280 が 1 . 7 の高純度の核酸が得られ、P C R 反応に使用することが可能であった。

【 0 0 4 0 】

実施例 6 尿からの核酸抽出 (第 1 の方法)

2 0 m l の尿検体を、5 分間遠心処理 (回転数 1 4 0 0 0 r p m) を行った。上清を除去し、尿沈査を分離した。得られた尿沈査に、proteinase K (2 0 μ l) と、濃度 3 M のグアニジン塩酸塩、5 容量 % の TritonX-100 を含んだ反応液 2 0 0 μ l を添加後、攪拌、7 0 $^{\circ}$ C で 1 0 分間加熱した。D I G L Y M E 2 0 0 μ l を添加し、混合した。以上が分解工程である。

【 0 0 4 1 】

吸着工程では、上記スピнкаラム 8 に混合液を注ぎ、卓上遠心機を用いて、1 分間遠心処理 (回転数 6 0 0 0 r p m) を行った。

洗浄工程では、スピнкаラム 8 に洗浄液 (W 4) 1 1 (5 0 0 μ l) を注ぎ、1 分間遠心処理 (回転数 6 0 0 0 r p m) を行った。

回収工程では、スピнкаラム 8 に溶出液 (E 3) 1 2 (1 0 0 μ l) を注ぎ、2 分間室温 (2 5 $^{\circ}$ C) で放置した後、1 分間遠心処理を行って核酸を回収し、定量、純度評価を行った。

その結果、A260/A280 が 1 . 8 の高純度の核酸が得られ、P C R 反応に使用することが可能であった。

【 0 0 4 2 】

実施例 7 細胞からの核酸抽出 (第 1 の方法)

10⁶個のHeLa細胞をPBS (100 μ l) に分散させ、proteinase K(20 μ l)と、濃度3Mのグアニジン塩酸塩、5容量%のTritonX-100を含んだ反応液200 μ lを添加後、攪拌、70℃で10分間加熱した。DIGLYME 200 μ lを添加し、混合した。以上が分解工程である。

【0043】

吸着工程では、上記スピнкаラム8に混合液を注ぎ、卓上遠心機を用いて、1分間遠心処理(回転数6000rpm)を行った。

洗浄工程では、スピнкаラム8に洗浄液(W2)11(500 μ l)を注ぎ、1分間遠心処理(回転数6000rpm)を行った。

回収工程では、スピнкаラム8に溶出液(E1)12(100 μ l)を注ぎ、2分間室温(25℃)で放置した後、1分間遠心処理(回転数6000rpm)を行って核酸を回収し、定量、純度評価を行った。

その結果、A260/A280が1.8の高純度の核酸が得られ、PCR反応に使用することが可能であった。

【0044】

【発明の効果】

本発明の方法によれば、回収の収率を向上させるとともに、核酸回収までに要する時間を短縮し、操作性に優れ、汚染の影響が少ない核酸の精製分離方法を提供することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の実施例に於ける核酸の抽出プロセスを示す。

【図2】

本発明の実施例に於ける全血の構成を示す。

【図3】

本発明の実施例に於ける全血からの核酸抽出の手順中の分解工程を示す。

【図4】

本発明の実施例に於ける全血からの核酸抽出の手順(第1の方法)を示す。

【図5】

本発明の実施例に於ける全血からの核酸抽出の手順（第 2 の方法）を示す。

【図 6】

本発明の実施例に於ける混合液中の D I G L Y M E 濃度と相対核酸収量の相関を示す。

【図 7】

本発明の実施例に於ける混合液中の E L 濃度と相対核酸収量の相関を示す。

【図 8】

本発明の実施例に於ける D I G L Y M E および E L 混合添加液を用いた場合の添加液中の D I G L Y M E 比率と相対核酸収量を示す。

【図 9】

本発明の実施例に於ける反応液中の Tween20 含有量と相対核酸収量の相関を示す。

【図 1 0】

本発明の実施例に於ける反応液中の Tween80 含有量と相対核酸収量の相関を示す。

【図 1 1】

本発明の実施例に於ける反応液中の Triton X-100 含有量と相対核酸収量の相関を示す。

【図 1 2】

本発明の実施例に於ける反応液への消泡剤 C E - 4 5 7 添加量と相対核酸収量の相関を示す。

【符号の説明】

1 … ヒト全血、 2 … 赤血球、 3 … 白血球、 4 … 核、 5 … チューブ、 6 … P r o t e i n a s e K、 7 … 混合液、 8 … スピンカラム、 9 … 吸着担体、 1 0 … チューブ、 1 1 … 洗浄液、 1 2 … 溶出液、 1 3 … 吸着担体、 1 4 … カラム、 1 5 … 洗浄液、 1 6 … チューブ、 1 7 … チューブ、 1 8 … 溶出液、
1 0 1 … 全血添加、 1 0 2 … 反応液添加および攪拌、 1 0 3 … 混合溶液のインキュベート、 1 0 4 … 添加液の添加と攪拌、 1 0 5 … 吸引による核酸吸着、 1 0 6 … 洗浄液のカラムへの添加、 1 0 7 … 洗浄工程、 1 0 8 … 溶出液添加と静置、 1

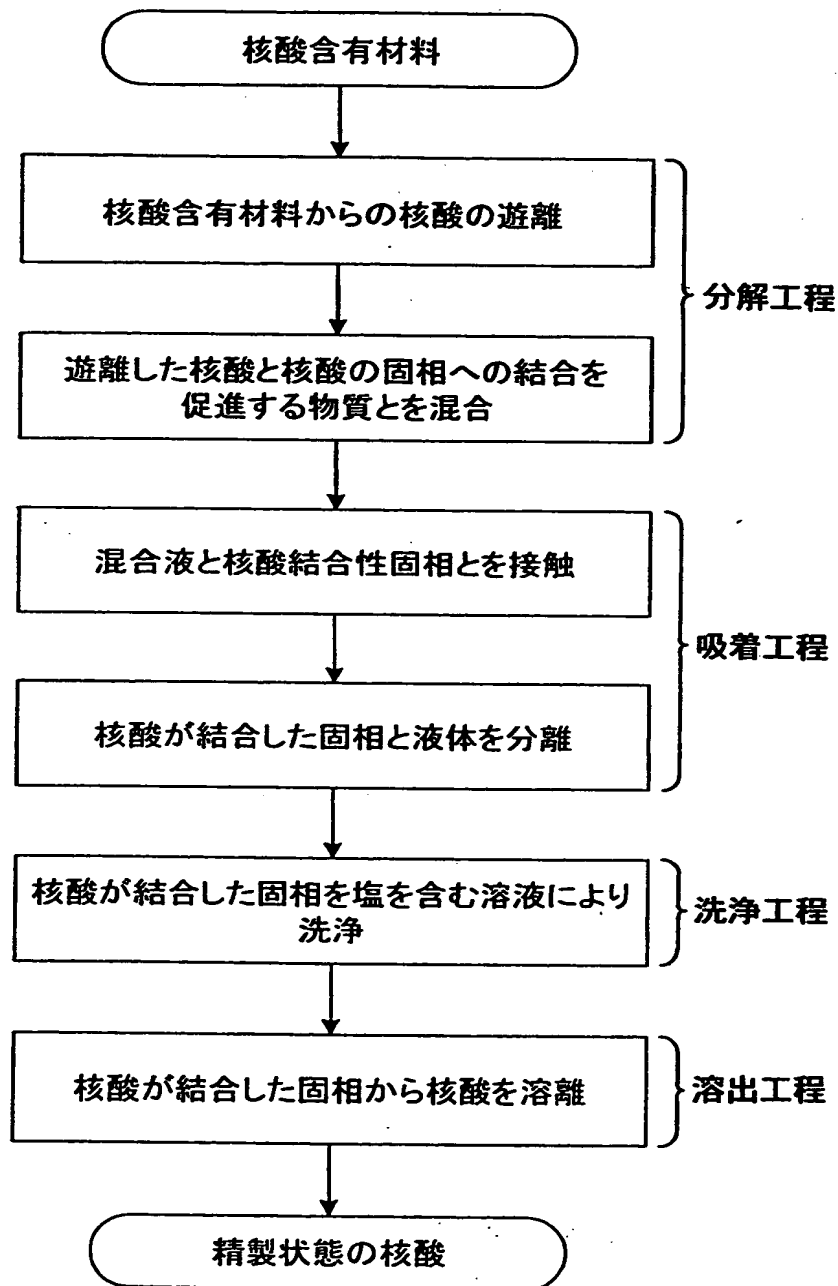
0 9 …核酸の回収、1 1 0 …吸引吐出による核酸吸着、1 1 1 …溶出液吸上げと
静置、1 1 2 …核酸の回収

【書類名】

図面

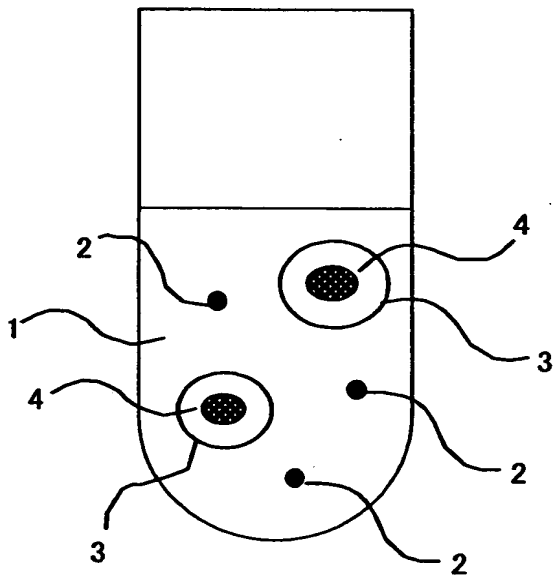
【図1】

図1



【図2】

図2



【图 3】

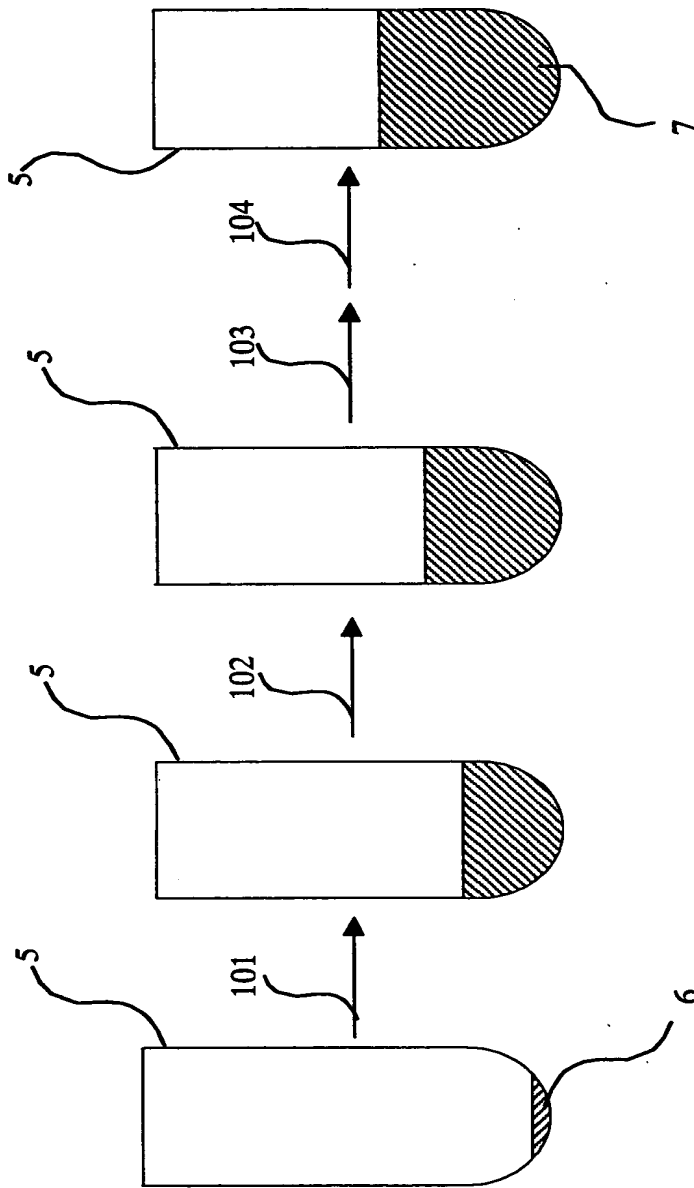


图 3

【図4】

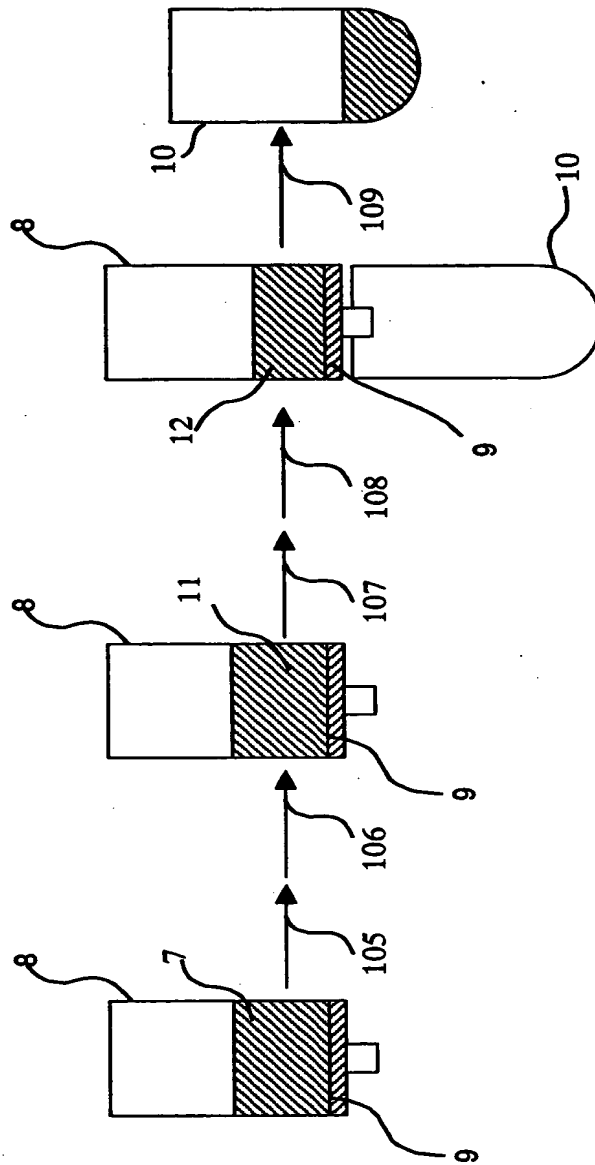


図4

【図5】

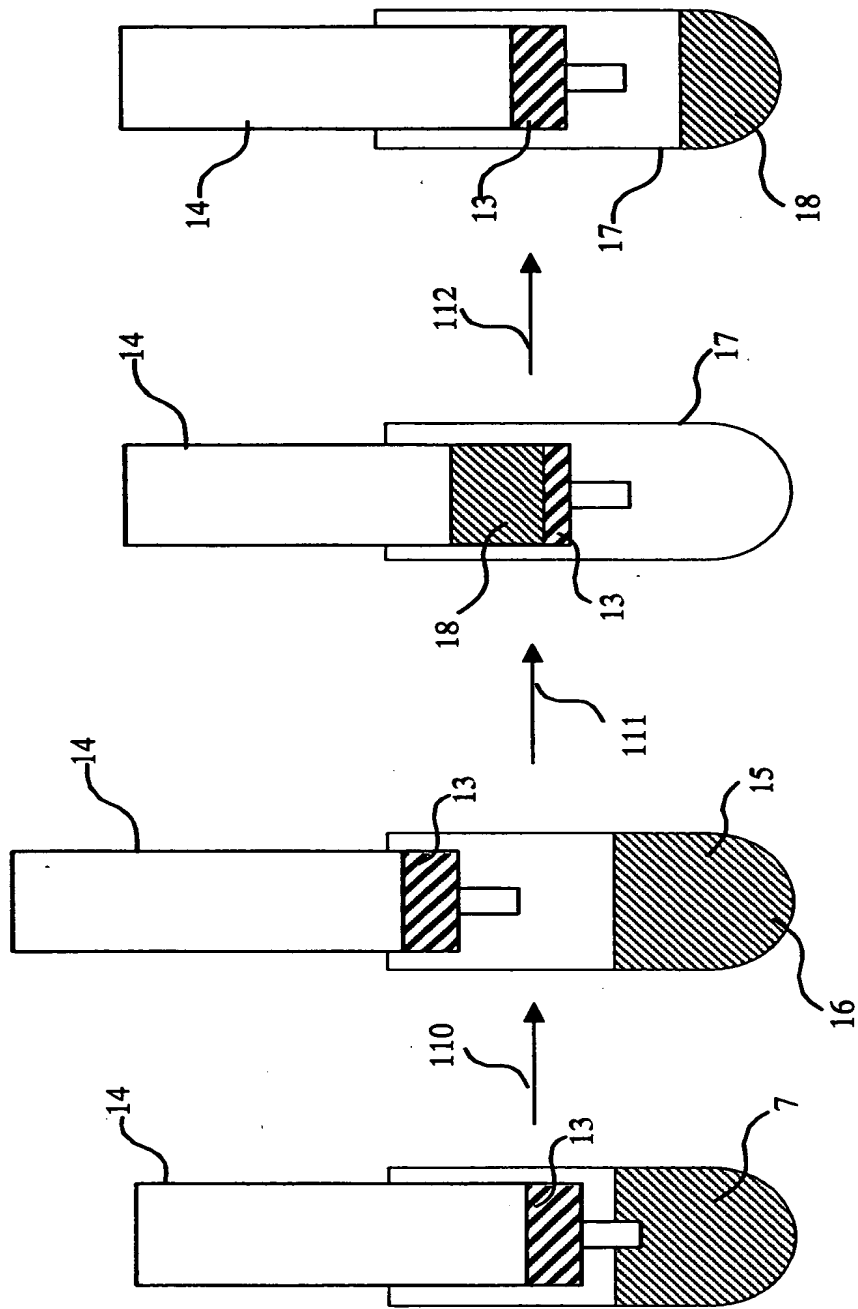
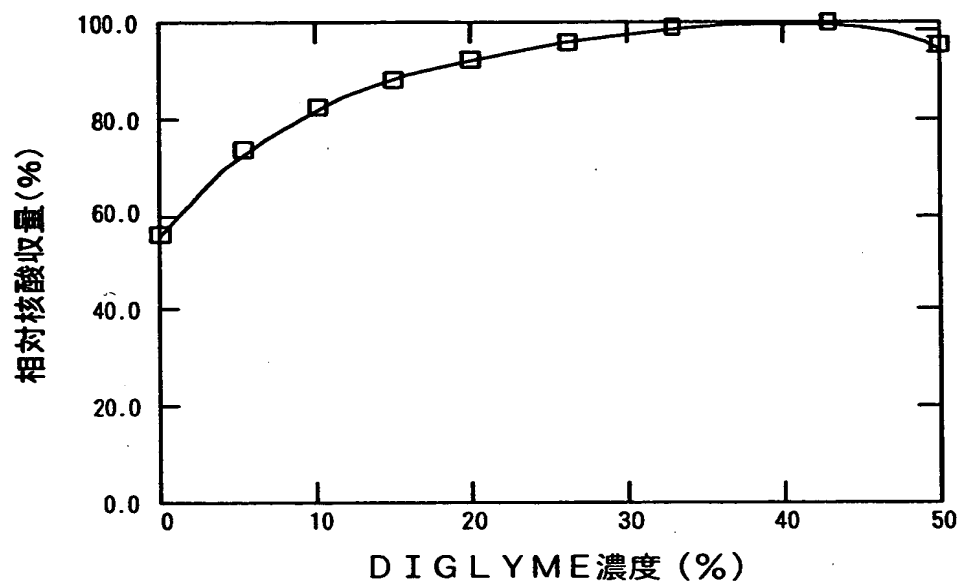


図5

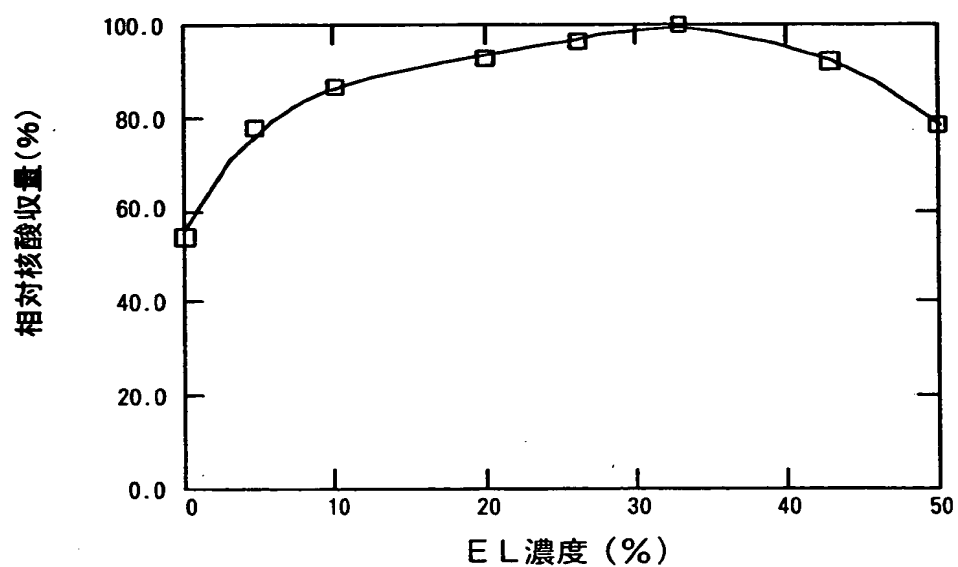
【図 6】

図 6

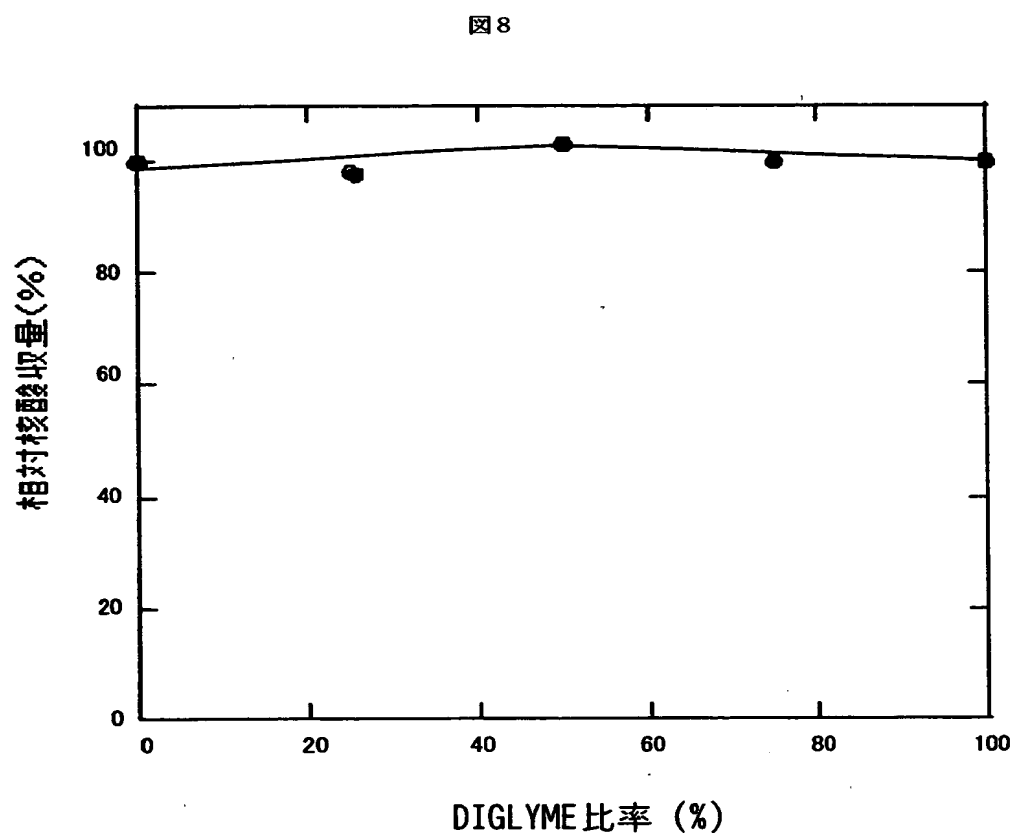


【図 7】

図 7

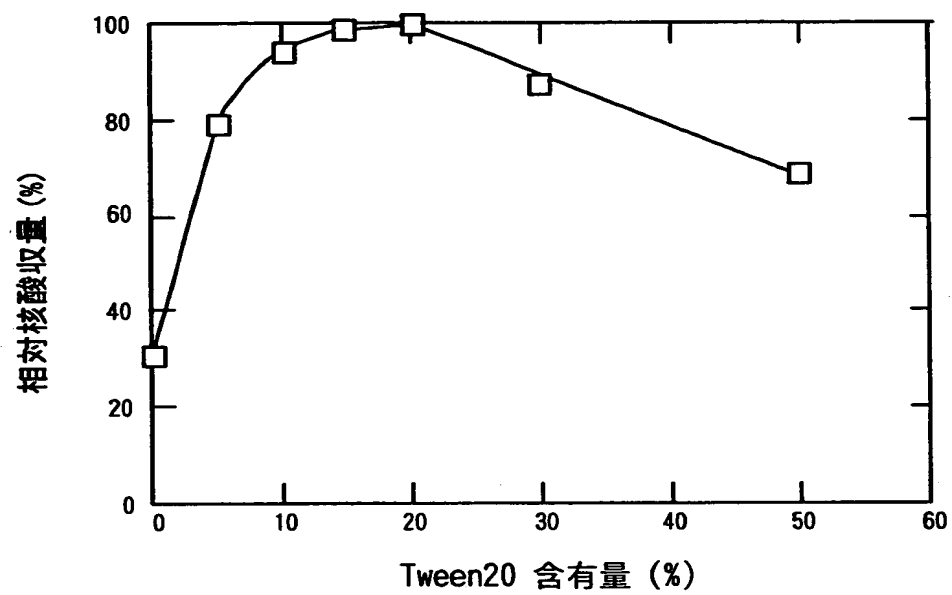


【図8】



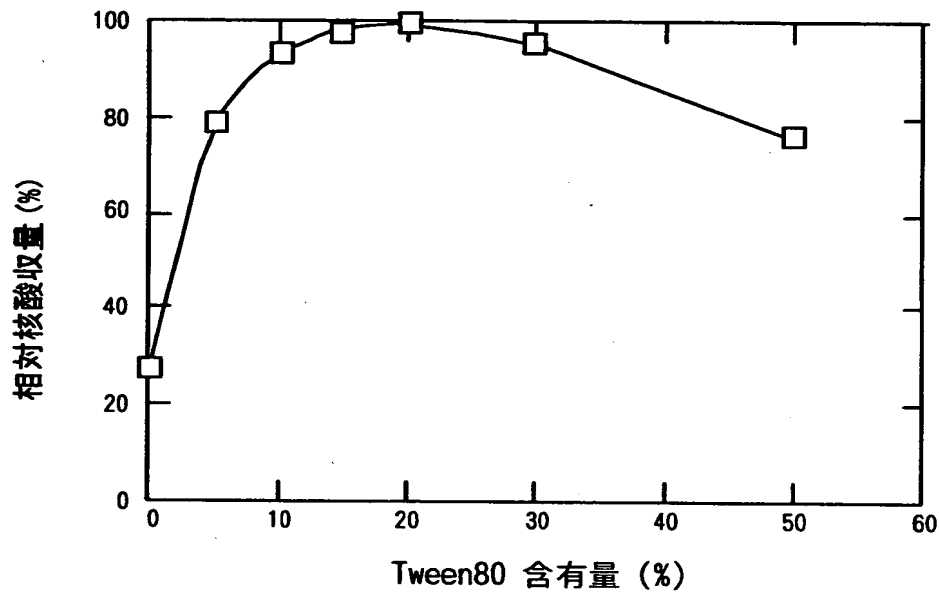
【図9】

図9



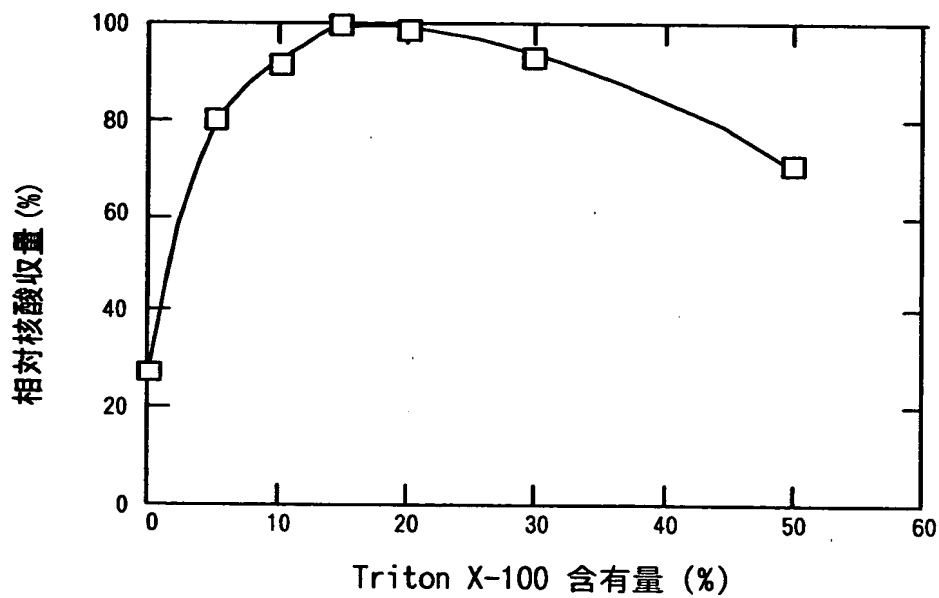
【図10】

図10



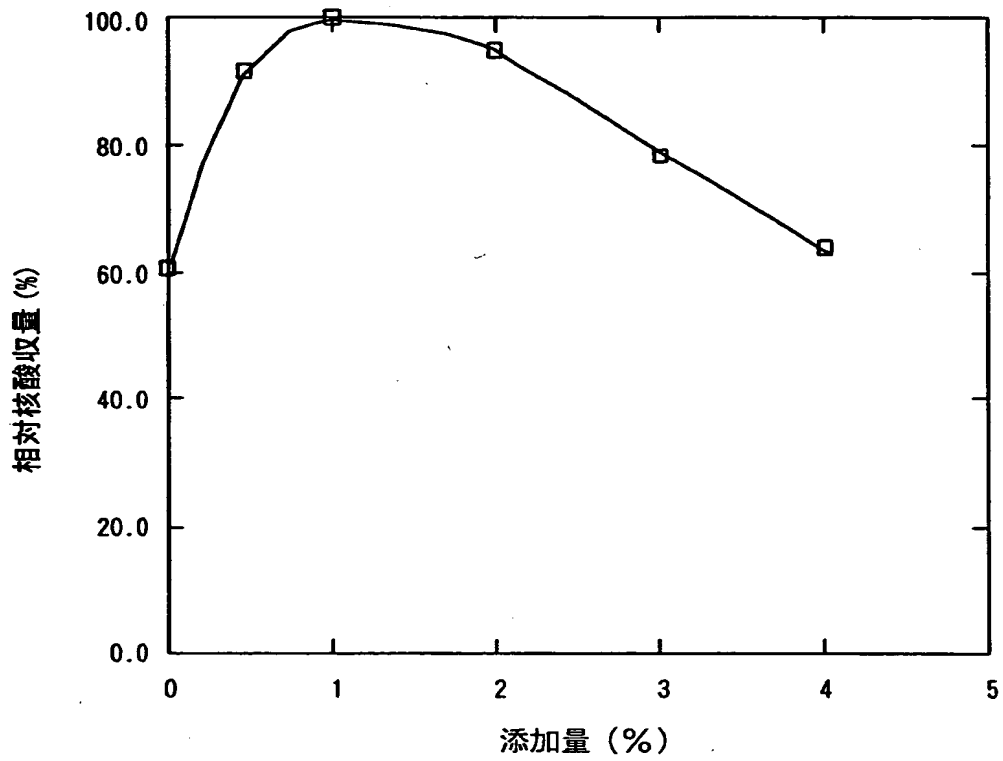
【図11】

図11



【図 12】

図 12



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 回収の収率を向上させ核酸の精製分離方法を提供する。

【解決手段】 核酸、塩、有機溶剤を含む混合液から核酸を無機担体に吸着させ、次に、溶出液によって核酸を担体から脱離させて回収する。有機溶剤は、脂肪族エーテル、脂肪族エステル、脂肪族ケトンの中から選ばれた 2 から 1 0 炭素数を有する化合物である。

【効果】 核酸回収の収率が向上し、操作性に優れ、汚染の影響が少ない。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005108]

1. 変更年月日 1990年 8月31日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地
氏 名 株式会社日立製作所